



# Interação entre as proteínas do soro de leite e os carotenóides majoritários do cajá: uma abordagem por *docking* molecular.

**Palavras-Chave:** Proteínas do soro do leite, Carotenoides, *Docking* Molecular

**Autores/as:**

ANA LUIZA ALMEIDA DE MARIA [UNICAMP]

MARIANA LAMY RASERA [UNICAMP]

Prof. Dr. GUILHERME MIRANDA TAVARES (orientador) [UNICAMP]

---

## INTRODUÇÃO:

Durante anos o soro de leite bovino foi considerado apenas um subproduto da cadeia de produção de queijos, entretanto com o acúmulo do conhecimento científico, o elevado potencial tecnológico e biológico de suas proteínas foi descoberto (Price, 2008; de Castro, et al., 2017). Em complemento ao potencial tecnológico e biológico das proteínas do soro de leite, esses biopolímeros também têm sido descritos por sua habilidade de interagir e proteger compostos bioativos contra condições adversas (Tavares et al., 2014). Tal propriedade tem grande potencial de aplicação no desenvolvimento de alimentos formulados adicionados de compostos bioativos, como os carotenóides. Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pela manifestação das cores amarela, laranja e vermelho em certos alimentos (Woodside et al., 2015). São compostos bioativos que apresentam atividade antioxidante devido às duplas ligações conjugadas em sua estrutura. Além disso, estes compostos também apresentam potenciais efeitos benéficos à saúde, dentre eles podemos citar a atividade pró-vitamina A que alguns carotenoides possuem (Stahl & Sies, 2003; Woodside et al., 2015).

Com o intuito de explorar as possibilidades de interação molecular entre as moléculas de interesse, previamente à validação experimental, o presente estudo aplicou a técnica computacional de *docking* molecular, buscando prever as melhores possibilidades de interação entre as proteínas do soro de leite bovino e os três principais carotenoides presentes na polpa do cajá (*Spondias mombin*) (Trott & Olson, 2010).

## METODOLOGIA:

O presente estudo foi realizado utilizando os seguintes softwares de uso aberto: Open Babel (J. Cheminf. 2011, 3:33), AutoDockTools (Morris et al., 2009), AutoDockVina (Trott e Olson, 2010), PyMol (Schrödinger, 2015) e Discovery Studio (Biovia, 2017).

Inicialmente as estruturas proteicas utilizadas para as simulações de *docking* molecular foram obtidas através do *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), sendo elas:  $\beta$ -lactoglobulina (PDB id: 3NPO),  $\alpha$ -lactoalbumina (PDB id: 1HFZ) e albumina do soro de leite bovino (BSA) (PDB id: 4F5S). Já as estruturas dos carotenoides foram obtidas no repositório *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) sendo elas: luteína (PubChem CID: 5281243),  $\beta$ -criptoxantina (PubChem CID: 5281235) e zeinoxantina (PubChem CID: 5281234).

Em seguida, foi realizada a conversão dos arquivos para “.pdb” utilizando o Open Babel e os arquivos foram tratados no AutoDockTools. Para as proteínas foi realizada a remoção das moléculas de água ligadas e foram adicionados hidrogênios polares faltantes. Já os carotenoides tiveram suas torções ativas travadas para evitar a ocorrência de isomerização durante a simulação. O *docking* foi realizado por meio do *software*

AutoDockVina, no qual se colocou um grid ao redor de toda a molécula de proteína para verificar em quais pontos os carotenoides poderiam interagir. Com os resultados foi possível obter o valor de afinidade calculada de cada binômio receptor-ligante. Esse parâmetro é um indicativo da energia de ligação entre as duas moléculas, logo, conforme mais negativo for esse valor, maior a estabilidade da interação. A visualização dos resultados obtidos foi feita utilizando dois *softwares* diferentes, o PyMol e o Discovery Studio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O *docking* molecular é uma ferramenta que apresenta muitas vantagens para a realização de estudos de interação de compostos, pois visa prever os mecanismos que ditariam as interações, propiciando a seleção de melhores condições para posterior validação experimental. Como, neste estudo, foram realizados somente os testes *in silico*, a comparação com o que ocorre experimentalmente foi possível com a utilização estudos disponíveis na literatura sobre as interações entre as proteínas do soro do leite e outros carotenóides.

**β-lactoglobulina:** esta é a proteína majoritária do soro de leite bovino, apresenta em sua estrutura uma cavidade de caráter hidrofóbico, que influencia positivamente sua interação com moléculas de caráter hidrofóbico, permitindo sua encapsulação (Deeth & Bansal, 2018; (Dima) *et. al.*, 2018). A Figura 1 apresenta a representação tridimensional do sítio mais favorável para o *docking* entre a β-lactoglobulina e a β-criptoxantina, entre a β-lactoglobulina e a luteína e entre a β-lactoglobulina e a zeinoxantina.

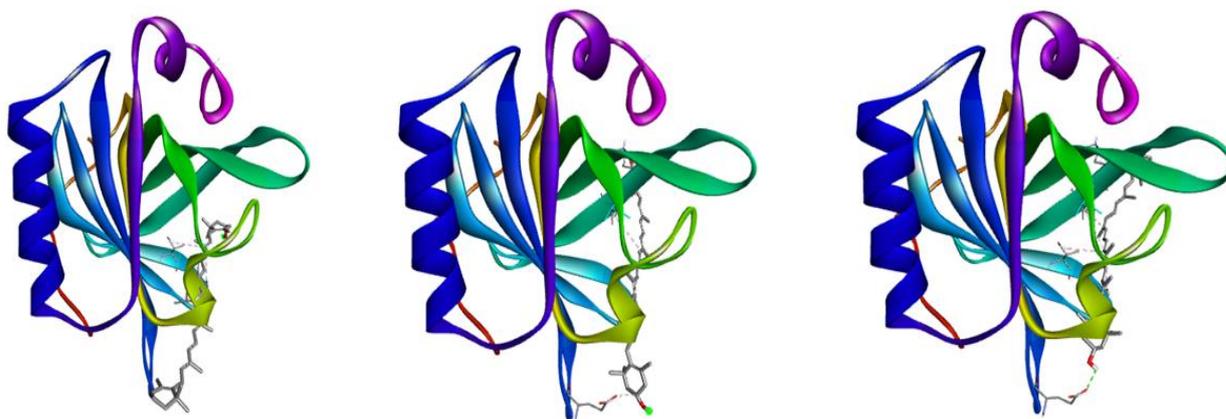


Figura 1: Representação 3D do principal sítio de interação entre β-lactoglobulina e β-criptoxantina, β-lactoglobulina e luteína e β-lactoglobulina e zeinoxantina (da esquerda para a direita). Visualização: Discovery Studio.

É observado que a região apontada como mais provável de interação entre os carotenoides e a proteína não ocorre exatamente no interior do seu calyx, como seria possível supor (Morales *et. al.*, 2021). Os três os sítios mais prováveis de interação entre a proteína e os três diferentes carotenoides são bastante próximos, provavelmente devido à similaridade estrutural entre eles (Allahdad *et. al.* 2019 e Couto 2021).

Avaliando a afinidade da ligação obtida na simulação, valores foram de -10kcal/mol para a β-criptoxantina, -9,5kcal/mol para a luteína e -8,8kcal/mol para a zeinoxantina. É observado que a afinidade da luteína e da zeinoxantina com a β-lactoglobulina foram inferiores, apesar de próximas, à da β-criptoxantina, o que indica que dentre os três ligantes, este último pode ser uma boa opção a ser avaliada experimentalmente. Entretanto, alguns parâmetros importantes para a interação experimental entre os compostos não são considerados no *docking* realizado, como temperatura, pH e interações com outros compostos, de forma que a ocorrência de divergências entre os dados apresentados e os obtidos experimentalmente pode ser esperada.

**α-lactoalbumina:** esta é a segunda proteína mais abundante no soro de leite bovino, ela apresenta uma estrutura globular compacta, com uma pequena bolsa hidrofóbica, e é estabilizada pela presença de um íon cálcio (forma holo). Segundo estudos, essa proteína também apresenta a capacidade de interagir com compostos bioativos de caráter hidrofóbico, um exemplo disso é o estudo feito por Delavari *et. al.* (2015), que

descreve a interação desta proteína com a vitamina D3. A Figura 2 apresenta a representação tridimensional do principal sítio de interação apontado para o *docking* entre a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -lactoalbumina e luteína e  $\alpha$ -lactoalbumina e zeinoxantina.

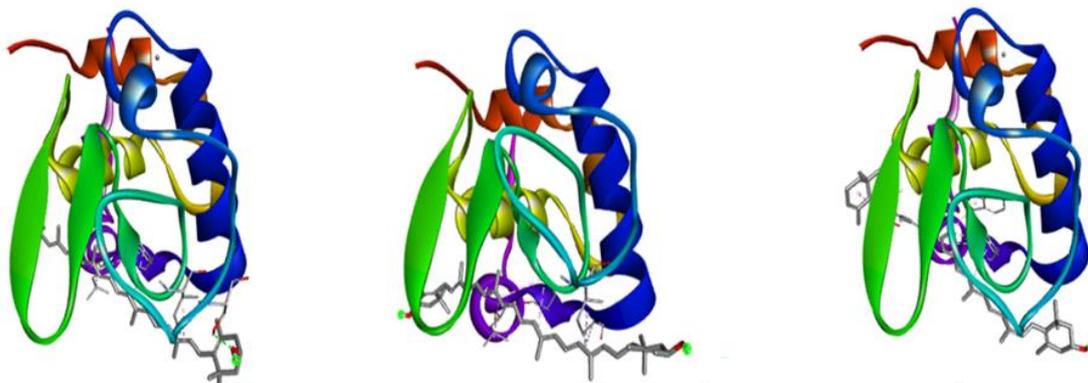


Figura 2: Representação 3D do principal sítio de interação entre  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -lactoalbumina e luteína e  $\alpha$ -lactoalbumina e zeinoxantina (da esquerda para a direita). Visualização: Discovery Studio.

Nesta representação é possível observar que assim como para a  $\beta$ -lactoglobulina, os três diferentes ligantes se concentraram em uma mesma região da proteína (sítio de maior afinidade), sendo essa a região reportada por seu caráter hidrofóbico da molécula (Delavari et. al. 2015). Observando a afinidade calculada para cada um compostos com a  $\alpha$ -lactoalbumina, tem-se -8,9kcal/mol para a  $\beta$ -criptoxantina, -9,6kcal/mol para a luteína e -10kcal/mol para a zeinoxantina. Este comportamento, que se difere do observado para a  $\beta$ -lactoglobulina, e corrobora a dependência da natureza e estrutura proteica em sua afinidade de ligação com outras moléculas.

**BSA:** A albumina do soro de leite bovino (BSA) é uma das proteínas presentes no soro de leite mais utilizadas em estudos de interação com compostos bioativos. A BSA apresenta em sua estrutura dois resíduos de triptofano e três domínios helicoidais que garantem sítios ativos altamente utilizados em interações (Wang et. al., 2016). A Figura 3 apresenta a representação tridimensional do principal sítio de interação apontado para o *docking* molecular entre a BSA e a  $\beta$ -criptoxantina, a BSA e a luteína e a BSA e a zeinoxantina.

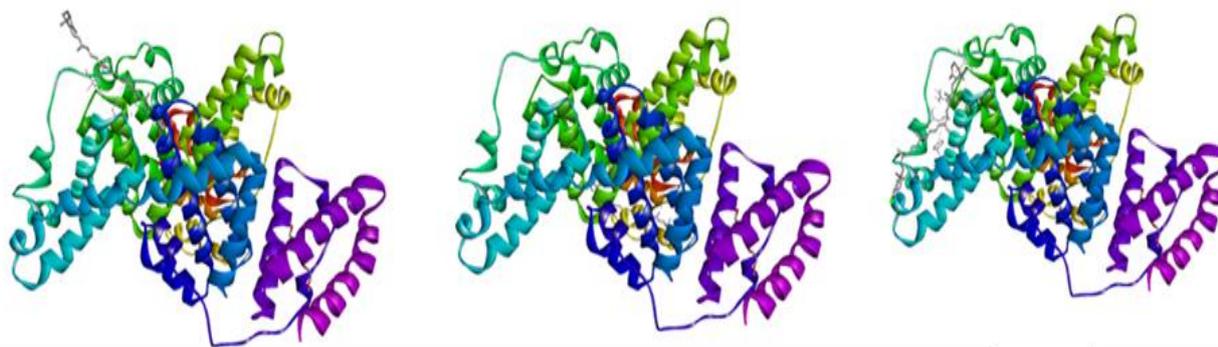


Figura 3: Representação 3D do principal sítio de interação entre BSA e  $\beta$ -criptoxantina, BSA e luteína e BSA e zeinoxantina (da esquerda para a direita). Visualização: Discovery Studio.

Pode-se observar que os sítios preferencias de interação entre a BSA e os três ligantes estudados se diferem entre si. Como a BSA é uma proteína maior (66 kDa), ela apresenta uma maior distribuição de zonas de caráter hidrofóbico, comparativamente às duas outras proteínas estudadas (Zhang et. al., 2017). Paiva et. al. (2020) ao estudar a interação entre luteína e BSA verificou que as interações hidrofóbicas são as principais envolvidas na ligação entre essas moléculas. Com os principais sítios de interação entre a BSA e os três carotenoides apresentando afinidades calculadas de -9,5kcal/mol para a  $\beta$ -criptoxantina, -9,2kcal/mol para a

luteína e -9,4kcal/mol para a zeinoxantina, espera-se que todos os ligantes tenham estabilidade de interação similares com a proteína experimentalmente.

## CONCLUSÕES:

Observou-se que diversas conclusões obtidas pelas simulações de interação encontram suporte em resultados disponíveis na literatura obtidos experimentalmente. A realização de testes *in silico* para prever as interações mais vantajosas em cada binômio receptor-ligante são uma ótima opção de testes preliminares a serem realizados, pois não há o mesmo gasto com materiais, equipamentos e energia que os testes em bancada exigem. É notório que a realização do *docking* molecular não permite elucidar, por si só, os mecanismos de interação entre proteínas e compostos bioativos. Neste sentido, complementação dos resultados pela realização de experimentos em laboratório é importante para aumentar a confiança nos mecanismos propostos.

## BIBLIOGRAFIA

(DIMA), I. G., APRODU, I., RAPEANU, G., & STANCIUC, N. Binding mechanisms between lycopene extracted from tomato peels and bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Luminescence*, v. 203, p. 582-589, 2018.

ALLAHDAD, Z. et al. Binding of  $\beta$ -carotene to whey proteins: multi-spectroscopic techniques and docking studies. *Food chemistry*, v. 277, p. 96-106, 2019

COUTO, Brunna D. Onofre et al. Characterization, techno-functional properties, and encapsulation efficiency of self-assembled  $\beta$ -lactoglobulin nanostructures. *Food Chemistry*, v. 356, p. 129719, 2021.

Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, version 16.1.0.15350, San Diego: Dassault Systèmes, 2017.

DE CASTRO, R. J. S. et al. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, v. 14, n. December 2016, p. 17–29, 2017.

DEETH, H. C.; BANSAL, N. (Ed.). *Whey proteins: from milk to medicine*. Academic Press, 2018.

DELAVARI, Behdad et al. Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocolloids*, v. 45, p. 124-131, 2015.

MORALES, Edgar Alan Cortes et al. Comparison of low-and high-methoxyl pectin for the stabilization of whey protein isolate as carrier for lutein. *Food Hydrocolloids*, v. 113, p. 106458, 2021.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S. AND OLSON, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry* 2009, 16: 2785-91.

O'BOYLE, N.M., BANCK, M., JAMES, C.A. et al.. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* 3, 33 (2011). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

PAIVA, P.H.C., COELHO, Y.L., DA SILVA, L.H.M., PINTO, M.S., VIDIGAL, M.C.T. AND PIRES, A.C.D.S. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. *Food Chemistry*, v. 305, p.125463, 2020.

PRICE, J. History of the development and application of whey protein products. In: *Whey Proteins*. Academic Press, 2019. p. 51-95.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 2.0. 2015

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.

TAVARES, G. M. et al. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 5–20, 2014.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n 1, p. 455-461, 2010.

WANG, Qi et al. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 156, p. 155-163, 2016.

WOODSIDE, J. V. et al. Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, v. 80, n. 1, p. 63–68, 2015.

ZHANG, Yin-Fei et al. Investigation of the binding interaction between estazolam and bovine serum albumin: multi-spectroscopic methods and molecular docking technique. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, n. 16, p. 3605-3614, 2017.